



А.К. Фролов¹, А.И. Токаренко²

ИЗМЕНЕНИЯ ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОД ВЛИЯНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ

¹Запорожский национальный университет,

²Запорожская медицинская академия последипломного образования

Ключові слова: гірудотерапія, лейкоцити, ізольовані зразки крові, субпопуляції лімфоцитів, клінічні показники самопочуття.

Ключевые слова: гирудотерапия, лейкоциты, изолированные образцы крови, субпопуляции лимфоцитов, клинические показатели самочувствия.

Key words: hirudotherapy, leukocytes, isolated samples of blood, subpopulations of lymphocytes, the clinical indicators being.

Позитивна динаміка клінічних симптомів у хворих у процесі гірудотерапії супроводжувалась відповідними кількісними й функціональними змінами лейкоцитів і лімфоцитів у периферичній крові, що були подібними в ізольованих зразках крові під впливом біологічно активних речовин слини медичної п'явки. Зокрема, відзначено зменшення надлишкової активності ініціюючих (CD4⁺, CD25⁺) і помірну стимуляцію інгібуючих імуногенез субпопуляцій лімфоцитів, що не виходила за межі фізіологічних значень.

Положительная динамика клинических симптомов у больных в процессе гирудотерапии сопровождалась количественными и функциональными изменениями лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови, которые были сходными в изолированных образцах крови под влиянием биологически активных веществ слюны медицинской пиявки. Так, отмечено уменьшение избыточной активности иницирующих (CD4⁺, CD25⁺) и умеренную стимуляцию ингибирующих иммуногенез субпопуляций лимфоцитов, которая выходила за границы физиологических значений.

Positive dynamics of clinical symptoms in patients during hirudotherapy was accompanied by the quantitative and functional changes of leukocytes and lymphocytes in the peripheral blood that were similar in isolated samples of blood under the influence of biologically active substances of **saliva** of the medicinal leech: reduction of excessive activity triggers (CD4⁺, CD25⁺) and moderate stimulation of inhibitory immunogenesis subpopulations of lymphocytes in the limits of their physiological values.

Гірудотерапія (ГТ), являясь древнейшим лечебным средством, остается эмпирической по методу применения. Ее трудно стандартизировать по количеству использованных медицинских пиявок (МП) на сеанс, по частоте сеансов на курс, по числу курсов в году. Опытным путем достигается также выбор мест приставок МП и их чередование [1]. Одной из причин данного эмпиризма является недостаточная квалификация специалистов в области ГТ. Поэтому назрела необходимость сертификации врачей, которые занимаются ГТ (гирудотерапевтов). Несмотря на эти нерешенные проблемы, ГТ широко используется в лечебных учреждениях. Научно обоснован механизм действия отдельных компонентов биологически активных веществ (БАВ) слюны МП, которые оказывают широкий спектр терапевтического действия: противовоспалительное, регенерационное, бактериостатическое, иммуномодулирующее, регулируют гомеостаз, сосудистый тонус и др. [2].

Учитывая, что одной из основных функций иммунной системы является регуляция антигенструктурного гомеостаза организма соответственно его генотипу на данном этапе онтогенеза в процессе роста, развития и регенерации [3,4], мы считаем, что большинство указанных терапевтических эффектов прямо или косвенно опосредуются участием иммунитета. Кроме того, согласно электрофоретическим данным, в слюне МП обнаружено более 100 компонентов БАВ, которые являются антигенами для человека. БАВ определенным образом влияют на иммунную систему, что еще раз подчеркивает значимость иммунологических исследований в гирудологии. В доступной специальной

литературе нет сведений об иммунологических сдвигах крови при ГТ, за исключением данных об активации фагоцитарной реакции нейтрофилов [5].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение количественных и функциональных показателей лейкоцитов под влиянием БАВ слюны МП *in vivo* и *in vitro* до и после воздействия МП.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведен стандартный курс ГТ 20 больным гипертонической болезнью II–III стадии, АГ I–II степени (6 мужчин и 14 женщин, средний возраст 52,3±6,9). Всем больным проводили сходный по объему и длительности курс ГТ. Лейкоцитарные сдвиги в крови анализировали до и после ГТ у одних и тех же больных, что позволило объективно оценить данное терапевтическое воздействие. Учитывая названные факторы и цель работы, проведен клинический осмотр с констатацией самочувствия пациентов по визуально-аналоговой шкале (VAS) [6]. Курс ГТ проводили амбулаторно (постановка 20–30 МП на протяжении 3,5–4,5 недель). Образцы крови из вены в объеме до 10 мл отбирали до начала ГТ и на 1 неделю после окончания курса ГТ. Кровь стабилизировали кристаллическим гепарином (Спофа) в конечной концентрации 0,2 мг/мл. Часть образца крови (5 мл) помещали во флакон, закрывали биопленкой, к которой приставляли МП для кормления. МП снимали с флакона через 15 мин активного сосания. Остальная часть венозной крови оставалась интактной, не подвергнутой *in vitro* БАВ слюны МП. Во всех интактных образцах венозной крови и в



Лейкоцитарные сдвиги под влиянием биологически активных веществ медицинской пивавки

Изученные показатели	Интактные образцы крови		Флаконные образцы крови	
	до ГТ	после ГТ	до ГТ	после ГТ
лейкоциты, Г/л	5,36±0,22	4,85±0,18*	Δ 3,42±0,14	Δ 3,82±0,11*
лимфоциты, % Г /л	38,8±2,1	31,8±1,8*	Δ 33,6±1,2	Δ 37,2±2,2*
	2,08±0,12	1,54±0,11*	Δ 1,15±0,11	1,42±0,13*
Е-РОК СП, % всего (CD2) Л > 8ЭБ	68,4±2,4	62,6±2,1*	Δ 56,7±2,1	65,3±2,4*
	39,6±2,3	30,3±2,0*	Δ 23,0±1,6	Δ 40,7±2,05*
Е-РОК CD3, % всего Л > 8ЭБ	67,3±3,3	57,0±2,4*	Δ 49,0±2,1	54,3±2,3*
	29,0±1,9	22,4±1,5*	Δ 18,4±1,4	20,0±1,9
Е-РОК CD4, % всего Л > 8ЭБ	41,0±2,1	35,8±1,8*	Δ 32,0±1,4	39,0±2,0*
	18,0±1,4	13,3±1,1*	Δ 10,7±1,1	10,0±1,2
Е-РОК CD8, % всего Л > 8ЭБ	17,0±1,5	27,5±2,1*	Δ 25,0±1,9	29,7±1,8
	4,5±0,3	9,5±0,5*	4,0±0,6	12,0±1,0*
Е-РОК CD16, % всего Л > 8ЭБ	27,3±1,8	34,0±2,0*	26,8±1,6	31,0±2,9*
	10,0±1,1	11,0±1,2	Δ 6,0±0,7	8,0±0,7
Е-РОК CD22, % всего Л > 8ЭБ	22,5±1,4	23,8±1,5	Δ 28,5±1,9	Δ 31,7±1,8
	9,2±0,9	7,4±0,6	Δ 3,3±0,3	Δ 13,0±0,9
Е-РОК CD25, % всего Л > 8ЭБ	32,0±2,2	19,0±1,6*	Δ 17,5±1,4	16,3±1,3
	13,0±1,2	8,2±0,6*	Δ 4,5±0,5	6,3±0,5

Примечание: * – различия показателей до и после ГТ достоверны ($p < 0,05$); Δ – различия между интактными и флаконными образцами крови достоверны ($p < 0,05$).

крови, оставшейся во флаконе после кормления МП, определяли количество лейкоцитов, лимфоцитов. В выделенной на фиколл – верографиновом градиенте (1,077 г/мл) суспензии лимфоцитов определяли их количественные и функциональные показатели с помощью спонтанного (Е-РОК СП) и МКАТ к CD-зависимого (Е-РОК-CD) розеткообразования с использованием эритроцитарных диагностикумов к CD3, CD4, CD8, CD16, CD22, CD25 (НПО «Гранум», г. Харьков). Функциональное состояние лимфоцитов оценивали с помощью avidного розеточного теста: по количеству присоединившихся к лимфоциту эритроцитов барана (ЭБ). Результат теста зависит от плотности соответствующих CD-структур на клеточной мембране лимфоцита. При антигенной или митогенной стимуляции плотность CD-структур на лимфоцитах увеличивается, показано, что лимфоциты, которые присоединили 8 и более ЭБ ($L > 8$ ЭБ) относятся к активированным [7].

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью пакета программ «Statistica 6,0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У всех больных уже после 2–3 сеансов ГТ отмечены положительные клинические сдвиги, а к концу курса ГТ эта динамика закрепились в виде стойкого клинического улучшения. Имело место купирование большинства исходных симптомов. Больные отмечали улучшение общего самочувствия, нормализацию сна, повышение работоспособности. Длительность эффекта сохранялась 3–4 месяца (срок наблюдения).

Согласно результатам субъективной 10-балльной визуальной аналоговой шкалы VAS [6], на фоне лечения достигнуто значительное улучшение общего состояния здоровья пациентов и, соответственно, качества жизни. До проведения ГТ этот показатель составил в группе $8,9 \pm 0,8$ баллов, а после лечения $4,1 \pm 0,9$ баллов.

Детально анализировали иммунологические показатели интактных и флаконных образцов венозной крови до и после ГТ. Прежде всего, обнаружены значительные отличия показателей между интактными и флаконными образцами венозной крови, взятых у больных до ГТ (табл. 1).

Так, во флаконных образцах венозной крови после ее обработки БАВ слюны МП происходило резкое снижение количества лейкоцитов (на 33,6%, $p < 0,05$) и лимфоцитов (на 44,7%, $p < 0,05$). Среди последних снижалось общее количество Е-РОК СП CD2 популяции лимфоцитов и их avidность к ЭБ ($L > 8$ ЭБ). Снижение тех же характеристик для CD3 популяции лимфоцитов было еще большим. Вместе с тем, отмечена тенденция к увеличению популяции В-лимфоцитов (CD22). Выявлено также существенное влияние БАВ слюны МП на показатели регуляторных и эффекторных субпопуляций лимфоцитов. Так, во флаконных образцах венозной крови, взятой до ГТ, уменьшалась частота и avidность к ЭБ CD4⁺ субпопуляции и CD25⁺ субпопуляции ($p < 0,05$). Изменения CD8⁺ субпопуляции во флаконных образцах крови имело обратную динамику: достоверно повышалось их общее количество и активированная фракция ($L > 8$ ЭБ). Доля CD16⁺ клеток оставалась статистически неизменной.

После ГТ происходили существенные изменения показателей лейкоцитов во всех образцах крови. Так, в венозной интактной крови пациентов отмечено уменьшение количества лейкоцитов и, в частности, лимфоцитов основных популяций: CD2⁺ (Е-РОК) и CD3⁺. Снижалась не только их общая численность, но и доля активной фракции ($L > 8$ ЭБ). Популяция В-лимфоцитов (CD22⁺) не имела существенных изменений.

Под влиянием ГТ в периферической крови происходила существенная перестройка среди регуляторных и эффекторных субпопуляций. Так, в интактных образцах венозной крови уменьшилось количество и avidность к ЭБ среди



Т-хелперов ($CD4^+$) и доля активированной субпопуляции лимфоцитов ($CD25^+$). Одновременно повышалось количество Т-киллерной/супрессорной субпопуляции лимфоцитов ($CD8^+$), и доля натуральных киллеров ($CD16^+$).

Обнаруженные изменения показателей лейкоцитов и лимфоцитов в интактных образцах венозной крови, не подвергнутых БАВ слюны МП, но взятых после ГТ, были весьма сходными с таковыми во флаконных образцах венозной крови под влиянием БАВ слюны МП, но взятых до ГТ. Однако после ГТ реакция лейкоцитов и, в частности, лимфоцитов, изолированных во флаконе, на БАВ слюны МП значительно отличалась от флаконных образцов до ГТ. Так, во флаконных образцах венозной крови после ГТ также отмечено снижение количества лейкоцитов и лимфоцитов, но это снижение было не таким резким, как до ГТ – на 21,3% и 7,8% соответственно. Относительная частота популяций и субпопуляций лимфоцитов и их активных фракций ($IL-8^+$ ЭБ) статистически соответствовала интактным образцам крови (для $CD3^+$, $CD16^+$) или имела место тенденция к ее увеличению (для $CD2^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD22^+$). Исключение составляла доля активированных лимфоцитов $CD25^+$ субпопуляции, количество которых продолжало снижаться и во флаконных образцах крови после ГТ.

Анализ изменений лейкоцитов и лимфоцитов после ГТ в интактных и флаконных образцах венозной крови позволил объяснить динамику лейкоцитарных сдвигов под влиянием БАВ слюны МП. Так, существенное снижение лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови у большинства пациентов на первой неделе после ГТ, несомненно, обусловлено их перераспределением в организме и временным депонированием в областях приставок МП. Известно, что МП при питании активирует местную микроциркуляцию. Формируется кожно-висцеральный шунт с дополнительным вовлечением капилляров в сосательной зоне диаметром 10–15 см и глубиной 7–10 см [8]. В данной зоне иммунокомпетентные клетки, депонируясь, принимают участие в физиологической и репаративной регенерации.

Во флаконных образцах венозной крови под влиянием БАВ слюны МП также происходило снижение количества лейкоцитов и лимфоцитов. Механизм этого снижения *in vitro*, по-видимому, был иным, чем в организме больных после ГТ. Несомненно, оно обусловлено реакцией апоптоза клеток, как результат непродуктивного иммуногенеза. В состав БАВ секрета МП входят блокаторы иммунологических реакций (бделины, эглины, гирустезин и др.) [2]. Они подавляют активность протеолитических ферментов, цитокинов, которые выделяются иммунокомпетентными клетками на начальных этапах иммунного ответа. Активность клеток также снижается путем протеолитического снятия с мембран клеток соответствующих рецепторов и структур. Поэтому наведение реакций апоптоза на изолированные лейкоциты крови – это проявление местного противовоспалительного эффекта МП при ГТ. МП, питаясь, образует 3-лучевую ранку диаметром 3–4 мм и 1,5–2 мм глубиной с подлежащей деструкцией сосудов и соединительной ткани. Зона гиперемии вокруг ранки в норме занимает около 5 мм

в диаметре, а заживление ранки происходит через 2–3 дня без других проявлений воспаления и без косметических дефектов кожи, что позволяет применять ГТ в косметологии. На уровне клеточных популяций подавление иммунологических реакций МП в съеденной крови осуществляется путем модуляции активности эффекторных и регуляторных субпопуляций лимфоцитов: снижается активность Т-хелперов ($CD4^+$) и повышается активность Т-киллеров/супрессоров ($CD8^+$). Однако функциональная активность последних как киллеров, становится непродуктивной вследствие подавления их активационной и пролиферативной реакции, о чем свидетельствует резкое снижение $CD25^+$ клеток, несущих рецептор к интерлейкину-2, основному митотическому цитокину. Вероятно, в этих условиях проявляется их супрессорная активность, направленная на Tx^+ -субпопуляцию.

Обнаруженное сходство перестройки эффекторных и регуляторных субпопуляций лимфоцитов во флаконных образцах крови, взятых до ГТ, и интактных образцах крови, взятых после ГТ, позволяет сделать вывод об основном механизме иммуотропного действия БАВ слюны МП в процессе ГТ.

Эта схожесть проявляется, во-первых, в отсутствии выраженных местных воспалительных реакций на месте укуса МП при ГТ и наведением апоптотических реакций лейкоцитов в изолированных образцах крови. Во-вторых, имеет место умеренное ингибирующее влияние на субпопуляции лимфоцитов, которые обеспечивают начальные этапы иммуногенеза ($CD4^+$, $CD25^+$) и адекватной активации субпопуляций, ответственных за супрессию иммунологических реакций ($CD8^+$, $CD16^+$), которая проявляется на заключительных этапах иммунного ответа, подавляя иммуногенез, в основном, его пролиферативную стадию. Параллелизм иммуотропного действия БАВ МП при ГТ и *in vitro* обусловлен общей эволюцией МП и водопойных млекопитающих – основных хозяев-кормителей первых. Результатом этой совместной эволюции стало формирование мутуалистических биологических связей. С одной стороны, МП подавляет иммунологическую активность поглощенной крови, решает для себя проблему иммунологического конфликта типа «реакция трансплантат против хозяина». На уровне организма водопойных млекопитающих (включая человека) подавление местной воспалительной реакции и постпийное кровотечение, вымывающее часть БАВ, способствует попаданию БАВ слюны МП в виде микродоз в кровь. БАВ являются антигенами (АГ) для человека, способствуют формированию к ним низкодозовой толерантности, основным механизмом которой является стимуляция Т-супрессорных популяций ($CD8^+$), что и отмечено в исследованиях *in vivo* и *in vitro*. Негативно регулируют пролиферативную реакцию лимфоцитов и субпопуляция $CD16^+$ – натуральные киллеры.

О развитии толерантности к АГ БАВ слюны МП свидетельствует факт отсутствия выраженных иммунологических реакций на ГТ у большинства больных (88%), тогда как незначительные проявления приставочных реакций в виде местного зуда и небольшой гиперемии I степени, по данным О.Ю. Каменева и А.Ю. Барановского) отмечены у



12% лиц после первых приставок МП [2]. В проведенном исследовании легкая иммунологическая реакция I степени наблюдалась у одной (из 20 пациентов) больной гипертонической болезнью, параллельно принимавшей специфическую гипотензивную терапию. Указанные иммунологические реакции на АГ МП в дальнейшем купировались при продолжении ГТ за счет усиления индукции толерантности к АГ МП. В свою очередь, развитие иммунологической толерантности на АГ БАВ слюны МП в ходе ГТ способствует гармонизации хелперно-супрессорной регуляции иммуногенеза в организме больного, т. к. цитокины лимфоцитов не имеют клональной специфичности. Далее эта иммуномодуляция проявляется в большинстве терапевтических эффектов ГТ.

Накоплением сенсibilизированных лимфоцитов – клеток памяти – в ходе ГТ можно объяснить резистентность лимфоцитов к апоптотическим реакциям во флаконных образцах крови после гирудотерапии: отмечено снижение количества этих клеток на 7,8%, по сравнению с 44,7% до ГТ. Отмечена тенденция к повышению выявления методом Е-РОК CD большинства популяций и субпопуляций лимфоцитов как проявление специфической реакции бластной трансформации лимфоцитов на АГ БАВ слюны МП. Однако эта тенденция не распространяется на CD25⁺ субпопуляцию, частота которой продолжала снижаться во флаконных образцах венозной крови и после ГТ. Как уже отмечалось, активация лимфоцитов на специфические АГ сопровождается повышением плотности рецепторных структур на лимфоцитах, а следовательно, повышается разрешающая способность розеточных (как и других) иммунологических методов. Устойчивость лейкоцитов и лимфоцитов к апоптозу во флаконных образцах крови – проявление бустер-реакции лимфоцитов по типу вторичного иммунного ответа. Известно, что клетки памяти более устойчивы к апоптозу, чем «наивные» лимфоциты при первой встрече с антигеном [9]. Формирование и пролонгированное сохранение клеток памяти к спектру БАВ слюны МП, другим антигенам и аутоструктурам обеспечивает длительный (не менее 3–4 месяцев) терапевтический эффект после окончания ГТ [5].

ВЫВОДЫ

Снижение значений количества лейкоцитов и основных

популяций лимфоцитов (CD2 и CD3) в крови больных до физиологических после гирудотерапии происходило за счет купирования нарушений структурного гомеостаза и временного депонирования активированных лимфоцитов в местах приставок МП.

В изолированных во флаконе образцах венозной крови, взятой до ГТ, под влиянием БАВ слюны МП происходило резкое снижение количества лейкоцитов (на 33%) и лимфоцитов (на 44,7%). После ГТ это снижение было значительно ниже (на 21,3% и 7,8% соответственно).

Изменение соотношения регуляторных и эффекторных субпопуляций лимфоцитов в изолированных образцах венозной крови под влиянием БАВ слюны МП были подобными в периферической крови больных после ГТ: сдерживание избыточности инициирующих иммуногенез субпопуляций (CD4⁺ и CD25⁺) и умеренная стимуляция киллерно-супрессорных (CD8⁺ и CD16⁺) субпопуляций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баскова И.П. Гирудотерапия. Наука и практика / Баскова И.П., Саханян Г.С. – Тула: ИПП «Гриф и К», 2004. – 506 с.
2. Каменев О.Ю. Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии. Руководство для врачей / О.Ю. Каменев, А.Ю. Барановский – СПб.: ИГ «Весь», 2006. – 304 с.
3. Фролов О.К. Патогенетичний аналіз імунної системи: основні принципи / О.К. Фролов, Є.Р. Федотов, В.В. Копійка [та ін.] // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2004. – №3 (27). – С. 14–21.
4. Волошин Н.А. Лимфоцит – фактор морфогенеза / Н.А. Волошин // Запорожский медицинский журнал. – 2005. – №3. – С. 122.
5. Гирудотерапия: Руководство для врачей / [Под ред. В.А. Савинова]. – М.: ОАО Издательство «Медицина», 2004. – 432 с.
6. Gift A.G. Validation of a vertical visual analogue scale as a measure of clinical dyspnea / Gift A.G. // Rehab. Nurs. – 1989. – Vol. 14. – P. 313–335.
7. Фролова Л.А. Количественная и функциональная характеристика состояния иммунной системы методами спонтанного и антигелозависимого к CD-структурам розеткообразования с эритроцитами барана / Л.А. Фролова, В.В. Копейка, Е.Р. Федотов [и др.] // Лабораторная диагностика. – 2009. – №3(49). – С. 6–12.
8. Жаров Д.Г. Секреты гирудотерапии, или как лечиться пиявками / Д.Г. Жаров. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2003. – 320 с.
9. Ярилин А.А. Апоптоз, роль в патологии / А.А. Ярилин, М.Ф. Никонорова, А.А. Ярилина // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 3, №3. – С. 7–16.

Сведения об авторах:

Фролов А.К., д. мед. н., профессор каф. иммунологии и биохимии, зав. лабораторией биотехнологии ЗНУ.

Токаренко А.И., д. мед. н., профессор, зав. каф. терапии, физиотерапии, курортологии и профпатологии ЗМАПО.

Адрес для переписки:

Фролов Александр Кириллович. 69000, г. Запорожье, ул. Героев Сталинграда, д. 50, кв. 77.

Тел.: (061) 289 12 12; (066) 845 53 49.

E-mail: a_frolov@ukr.net